



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Patentschrift
10 DE 41 15 401 C 2

51 Int. Cl.⁵:
G 01 N 21/64

R1

- 21 Aktenzeichen: P 41 15 401.0-52
22 Anmeldetag: 10. 5. 91
43 Offenlegungstag: 19. 11. 92
45 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 14. 4. 94

DE 41 15 401 C 2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:
Uhl, Rainer, Dr., 82166 Gräfelfing, DE

74 Vertreter:
Schwan, G., Dipl.-Ing., Pat.-Anw., 81739 München

72 Erfinder:
gleich Patentinhaber

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

DE 36 04 815 C2
DE 38 17 739 A1
DE 34 36 752 A1
DE 30 05 352 A1

Rev. Sci. Instrum., 59, April 1988, S. 588-590;

54 Fluoreszenz-Meßvorrichtung zum Bestimmen der Ionenkonzentration eines Untersuchungsobjekts, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff eingefärbt ist, dessen Anregungsmaximum sich in Abhängigkeit von der zu bestimmenden Ionenkonzentration ändert

DE 41 15 401 C 2

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Fluoreszenz-Meßvorrichtung zum Bestimmen der Ionenkonzentration eines Untersuchungsobjekts, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff eingefärbt ist, dessen Anregungsmaximum sich in Abhängigkeit von der zu bestimmenden Ionenkonzentration ändert, gemäß dem Patentanspruch 1.

Bei einer bekannten, für spektralphotometrische Analysen bestimmten Meßvorrichtung (DE 30 05 352 A1) werden Lichtstrahlen von zwei oder mehr Lichtquellen strahleneintrittsseitig auf eine strahlungsundurchlässige Abdeckmaske gerichtet. Die Abdeckmaske erstreckt sich entlang dem sogenannten Rowland-Kreis des Beugungsgitters. Sie weist eine Mehrzahl von Spalten auf, welche geometrisch so angeordnet sind, daß sich bei Beleuchtung von jeweils nur einem Spalt der Abdeckmaske am Austrittsspalt ein monochromatisches Meßstrahlenbündel einer vorbestimmten Wellenlänge ergibt, die ihrerseits davon abhängt, welcher Spalt der Abdeckmaske jeweils beleuchtet ist. Vor oder hinter der Abdeckmaske ist eine Auswahlmaske angeordnet, die einen durch ihre Relativbewegung zur Abdeckmaske wiederholt nacheinander in Fluchtung mit den einzelnen Spalten der Abdeckmaske bewegbaren Spalt und ein die jeweils übrigen Spalte der Abdeckmaske durch Überdecken schließenden strahlungsundurchlässigen Bereich besitzt. Gepulste Beleuchtungseinheiten werden bei der bekannten Meßvorrichtung durch den Einsatz von getakteten Lichtquellen, beispielsweise Hohlkathodenlampen, realisiert. Dabei ist im Falle der bekannten Meßvorrichtung der minimale Abstand zwischen zwei benachbarten Lichtquellen, welcher die Wellenlängenauflösung des Systems, bestimmt, durch die Größe der Lichtquellen selbst vorgegeben. Dieser Abstand ist relativ groß, was zur Erzielung der benötigten Wellenlängenauflösung die Verwendung eines Gitters mit langer Brennweite notwendig macht. Der damit erzielbare geringe Lichtdurchsatz reicht z. B. für eine rauscharme Kalziumbestimmung durch Fluoreszenzmessung bei weitem nicht aus.

Zelluläre Eigenschaften und inter- sowie intrazelluläre Vorgänge können in zunehmendem Maße mit Hilfe optischer Methoden charakterisiert werden. Vor allem in der Biomedizin, u. a. beim Studium von komplexen Nerven- und Gehirnstrukturen, gewinnen optische Methoden an Bedeutung. Angesichts der emotionale geführten Debatte über Sinn und Notwendigkeit von Tierversuchen gilt dies besonders für Methoden zur Charakterisierung intakter Zellkulturen, welche in zunehmendem Maße Tierversuche ersetzen werden. Es stehen spezielle Fluoreszenzindikatoren zur Verfügung, mit denen sich die lebende Zelle anfärben und die räumliche Verteilung von für den Zellmetabolismus wichtigen Ionen (Magnesium, Kalium und Chlorid, vor allem aber Kalzium), registrieren läßt. Diese die Zellfunktion nicht beeinträchtigenden Farbstoffe, ändern ihr Fluoreszenzverhalten in Abhängigkeit von den intrazellulären Ionenkonzentrationen. Ein optisches Meßverfahren, das bereits besonders intensive Anwendung erfahren hat, ist die Fluoreszenzbestimmung von intrazellulärem Kalzium.

Um aus einer einzigen Fluoreszenzmessung absolute Konzentrationen bestimmen zu können, müßte man die genaue Konzentration des Farbstoffes in der Zelle und die Zelldicke kennen. Beides läßt sich nur mit großen experimentellem Aufwand bestimmen. Einen

Ausweg bietet eine Verhältnismessung, bei welcher die Fluoreszenz bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen ermittelt wird. Der Quotient der Meßwerte ist von Zelldicke und Indikatorkonzentration unabhängig und ein direktes Maß für die Ionenkonzentration.

Zum Bestimmen der Ionenkonzentration muß dementsprechend die Fluoreszenz eines Indikatorfarbstoffs bei zwei verschiedenen Wellenlängen angeregt und das Verhältnis der resultierenden Fluoreszenzintensitäten ermittelt werden. Bei den für diesen Zweck bisher verwendeten Geräten wird die Probe nacheinander mit den beiden verschiedenen Wellenlängen beleuchtet, und die Fluoreszenz wird mit Photomultipliern bestimmt (photometrische Spotmessung). Alternativ werden in der Bildebene eines Mikroskops mit einer CCD-Kamera nacheinander zwei bei verschiedenen Anregungswellenlängen erzeugte Fluoreszenzbilder aufgenommen. Ein Wechsel zwischen den Anregungswellenlängen wird dabei entweder

- (i) durch ein rotierendes Filterrad oder
- (ii) durch zwei Filter bzw. Monochromatoren mit nachgeschaltetem Chopperrad (DE 36 04 815 C2)

erhalten. Der Hauptnachteil dieser bekannten Anordnungen liegt in ihrer begrenzten Zeitauflösung und der erhöhten Störanfälligkeit von Geräten, die auf mechanisch bewegte Teile zurückgreifen, sowie bei (i) der mangelnden Flexibilität und bei (ii) dem großen Aufwand. Hinzu kommt, daß die für photometrische Messungen eingesetzten Photomultiplier teuer und anfällig sind sowie im interessierenden Spektralbereich eine geringe Quantenausbeute besitzen. Photodioden, die frei von diesen Nachteilen sind, können wegen ihres hohen Dunkelrauschens nicht eingesetzt werden.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Fluoreszenz-Meßvorrichtung zum Bestimmen von Ionenkonzentrationen, beispielsweise in Zellen, biologischen Schnitten oder einer Küvette, zu schaffen, die eine hohe Zeitauflösung erlaubt, die sich mit verhältnismäßig geringem Aufwand realisieren läßt und bei der sich die Anregungswellenlängen auf einfache Weise in einem weiten Bereich verändern lassen.

Ausgehend von der Meßvorrichtung nach der DE 30 05 352 A1 wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch die Merkmale des Patentanspruchs 1 gelöst.

Bei der Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach der Erfindung werden in der aus der DE 30 05 352 A1 bekannten Weise mit Hilfe eines Beugungsgitters die beiden verschiedenfarbigen Meßstrahlen in einem Strahl vereinigt. Dabei lassen sich aber vorliegend die Austrittsöffnungen der Lichtleiter in der Eintrittsspaltenebene des Beugungsgitters praktisch beliebig nahe aneinanderbringen, so daß ein Gitter mit vergleichsweise geringerer Lineardispersion verwendet und die Effizienz des Beugungsgitters voll ausgenutzt werden kann. Die erfindungsgemäße Meßvorrichtung erlaubt ferner eine fast beliebig genaue und sehr bequeme Wellenlängenselektion durch einfache Linearverschiebung der Austrittsöffnungen der Lichtleiter in der Eintrittsspaltenebene des Beugungsgitters. Mit wenigen Handgriffen kann die Wellenlänge über einen weiten Spektralbereich variiert und damit den unterschiedlichsten Meßanforderungen (Farbstoffen) angepaßt werden. Da ein Beugungsgitter mit einer Eintrittsspaltenebene (d. h. ein sogenanntes "Flat Field"-Gitter) vorgesehen ist, erfolgt die Verschiebung zur Wellenlängenselektion linear und nicht auf einem Kreisbogen.

Der Einsatz von Lichtleitern in solchen Meßgeräten ist zwar bekannt (Rev. Sci. Instrum. 59, April 1988, Seiten 588 bis 590 und DE 34 36 752 A1). Bei den bekannten Meßvorrichtungen sind jedoch die Ein- und Austrittsseiten der Lichtleiter mit Bezug auf die zugehörigen Vorrichtungsteile fest angeordnet.

In weiterer Ausgestaltung der Erfindung liegt in der Austrittspaltebene des Beugungsgitters die Eintrittsöffnung eines Lichtleiters, an dessen Austrittsseite das abbildende System angekoppelt ist.

Bei der Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach der Erfindung können zweckmäßig beide Beleuchtungseinheiten gepulst sein, wobei die beiden gepulsten Beleuchtungseinheiten vorzugsweise mit Blitzlampen versehen sind. Durch den Einsatz von Blitzlampen, deren gesamte Lichtenergie innerhalb kürzester Zeit (z. B. 1 μ s) freigesetzt wird, kann das Dunkelrauschen weitgehend eliminiert werden, da in dem kurzen Zeitfenster, während dessen die Detektoreinheit offen gehalten werden muß, nur wenige Rauschelektronen akkumulieren können. Da zudem die Anzahl der Blitze pro Wellenlänge variabel gestaltet werden kann, lassen sich Unterschiede in der Fluoreszenz-Effizienz bequem ausgleichen, wodurch sichergestellt werden kann, daß die für die Quotientenbildung genutzten Meßwerte in etwa gleich groß sind, was für das Signal/Rausch-Verhältnis des Quotienten von besonderem Vorteil ist.

Entsprechend einer abgewandelten Ausführungsform der Erfindung können die beiden gepulsten Beleuchtungseinheiten aber auch jeweils eine kontinuierliche Lichtquelle und einen im Strahlengang zwischen dieser Lichtquelle und dem Beugungsgitter angeordneten ansteuerbaren Verschuß aufweisen. Gemäß einer weiter abgewandelten Ausführungsform können die beiden gepulsten Beleuchtungseinheiten mit einer gemeinsamen kontinuierlichen Lichtquelle und zwei im Strahlengang zwischen dieser Lichtquelle und dem Beugungsgitter angeordneten, getrennt ansteuerbaren Verschlüssen ausgestattet sein. Dieser Verschuß bzw. diese Verschlüsse können vorteilhaft elektronisch ausgebildet sein. Derartige Verschlüsse machen eine Belichtungszeitsteuerung wie bei einer Kamera und somit eine flexible Anpassung an variierende Meßgegebenheiten möglich. Dem gegenüber drehen sich ein Filterrads bzw. ein Chopper für beide Wellenlängen immer mit konstanter Geschwindigkeit; sie gestatten damit keine derartige Anpassung.

In vorteilhafter weiterer Ausgestaltung der Erfindung ist eine elektrische, vorzugsweise rechnergesteuerte Auslösevorrichtung zum Triggern der beiden Blitzlampen bzw. der beiden Verschlüsse mit vorgegebenem zeitlichem Abstand vorgesehen.

Bei der Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach der Erfindung kann ohne großen Aufwand sichergestellt werden, daß das durch die gepulste Lichtquelle oder gepulsten Lichtquellen angeregte Fluoreszenzlicht innerhalb eines so kurzen Zeitfensters anfällt, daß bei einer vorgegebenen Photonenanzahl eine außerordentlich hohe Fluoreszenzintensität auftritt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die während eines Meßvorgangs applizierbare Photonenanzahl begrenzt ist, weil andernfalls die Indikatorfarbstoffe ausbleichen. In Meßsituationen, wo das Signal-Rauschverhältnis durch Dunkelrauschen limitiert ist, führen die erfindungsgemäß realisierbaren kurzen Zeitfenster zu einer deutlichen Steigerung des Signal/Rauschverhältnisses. Dies erlaubt in der Detektoreinheit den Einsatz von preiswerten und robusten Halbleiterdetektoren (Photodioden) an Stelle von teuren und

empfindlichen Sekundärelektronenvervielfachern. Solche Photodioden haben eine deutlich bessere Quantenausbeute, die ebenfalls dem Signal/Rauschverhältnis zugutekommt.

Weil vorliegend die Fluoreszenzwerte bei den verschiedenen Anregungswellenlängen so kurz hintereinander ermittelt werden können, kann aber einer quasi-gleichzeitigen Messung gesprochen werden. Beispielsweise entspricht der Zeitabstand zwischen einem Doppelblitz und damit die eigentliche Zeitauflösung der maximalen Blitzfrequenz der einzelnen Lichtblitze, beispielsweise Stroboskopblitze. Diese maximale Blitzfrequenz kann beispielsweise ohne weiteres einen Wert von etwa 1 kHz haben.

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung wird im folgenden unter Bezugnahme auf die Zeichnung beschrieben.

Die schematisch dargestellte Fluoreszenz-Meßvorrichtung weist zwei Beleuchtungseinheiten mit gepulsten Lichtquellen 1 und 2, beispielsweise in Form von Stroboskop-Blitzlampen, auf, deren Licht über ein zweckentsprechendes, nicht veranschaulichtes abbildendes System (Optik) in jeweils einen Lichtleiter 3 bzw. 4 eingekoppelt wird. Die Austrittsseiten der beiden Lichtleiter 3 und 4 befinden sich in der Eintrittspaltebene 5 eines Beugungsgitters 6. Im gezeigten Ausführungsbeispiel handelt es sich bei dem Beugungsgitter 6 um ein konkaves Gitter, das ohne Zuhilfenahme weiterer optischer Elemente die in der Eintrittspaltebene 5 liegenden Austrittsöffnungen der Lichtleiter 3 und 4 in der einer Austrittspaltebene 7 des Beugungsgitters befindlichen Eintrittsöffnung eines weiteren Lichtleiters 8 abbildet. Je nach dem, welche der beiden Lichtquellen 1 oder 2 gerade blitzt, resultiert in dem weiteren Lichtleiter 8 ein Lichtblitz unterschiedlicher Farbe. Die genaue Wellenlänge der Lichtblitze in dem weiteren Lichtleiter 8 läßt sich durch Verschieben der Austrittsöffnungen der Lichtleiter 3 und 4 in der Eintrittspaltebene 5 nach Wunsch unabhängig voneinander einstellen und somit unterschiedlichen Meßanforderungen, insbesondere unterschiedlichen Indikatorfarbstoffen, anpassen.

Die beschriebene Anordnung ermöglicht die Realisierung eines bichromatischen Intensitätszeitprofils, beispielsweise in Form einer bichromatischen Blitzfolge mit hoher Folgefrequenz und ohne die Notwendigkeit bewegter Teile. Im Normalfall wird man einen bichromatischen Doppelblitz wählen, wobei der zeitliche Abstand der beiden Blitze nur durch die Dauer der einzelnen Blitze (in der Regel wenige Millisekunden) und durch die Zeitauflösung oder Detektor-Verstärkerkombination limitiert ist, die in einer nachgeschalteten Detektoreinheit zur Messung des angeregten Fluoreszenzlichtes vorgesehen ist.

Es ist beispielsweise aber auch möglich, eine kontinuierliche Lichtquelle der Wellenlänge λ_1 mit einer gepulsten Lichtquelle der Wellenlänge λ_2 über das Beugungsgitter 6 zu kombinieren und die Fluoreszenzintensität bei Anregung mit der Wellenlänge γ_2 durch Differenzbildung zu ermitteln. Die gepulste Lichtquelle kann dabei entweder mit einem zusätzlichen Stroboskopblitz oder mit der bereits vorhandenen kontinuierlichen Lichtquelle sowie einem zusätzlichen, vorzugsweise elektronischen, Verschuß und einem Lichtleiter realisiert werden.

Die weiteren Bestandteile der Meßvorrichtung können in konventioneller Weise ausgelegt sein und seien daher vorliegend nur der Vollständigkeit halber kurz beschrieben.

Das aus dem weiteren Lichtleiter 8 austretende bichromatische Licht wird mittels eines abbildenden Systems, zu dem beispielsweise eine Linse 15 gehört, in den Auflichtstrahlengang eines Mikroskops 9 eingekoppelt und mit einem dichroitischen Spiegel 10 in den Mikroskopentubus eingespiegelt. Dieser dichroitische Spiegel 10 reflektiert die beiden Anregungswellenlängen, welche danach von einem Objektiv 11 in einer Objekt-ebene 12 fokussiert werden. Dort regen sie Indikator-moleküle zur Fluoreszenz an. Teile des abgestrahlten Fluoreszenzlichtes werden von dem Objektiv 11 wieder aufgefangen und passieren den dichroitischen Spiegel 10, der so ausgelegt ist, daß die beiden Anregungswellenlängen reflektiert, das von der Probe ausgesandte Fluoreszenzlicht dagegen transmittiert wird. Abgestrahltes Fluoreszenzlicht wird danach von einer Projektionslinse 13 in einer Beobachtungsebene 14 fokussiert, wobei ein vergrößertes Bild des Objekts in der Objektebene 12 erhalten wird. Für Spotmessungen ist in der Beobachtungsebene 14 ein einzelner Detektor, z. B. ein Halbleiterdetektor, für zweidimensionale Messungen beispielsweise eine CCD-Kamera angebracht.

Patentansprüche

1. Fluoreszenz-Meßvorrichtung zum Bestimmen der Ionenkonzentration eines Untersuchungsobjekts, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff eingefärbt ist, dessen Anregungsmaximum sich in Abhängigkeit von der zu bestimmenden Ionenkonzentration ändert, mit
 - zwei, jeweils eine Lichtquelle (1, 2) aufweisenden Beleuchtungseinheiten, von denen mindestens eine gepulst ist,
 - einem Beugungsgitter (6), das von den zwei Beleuchtungseinheiten so in seiner Eintrittsspaltebene (5) beleuchtet wird, daß in seiner Austrittsspaltebene (7) die beiden von den Beleuchtungseinheiten ausgehenden Strahlengänge vereinigt werden und dort in einem Strahlengang unter Bildung eines bichromatischen Intensitätszeitprofils unterschiedlicher Wellenlängen austreten,
 - einem abbildenden System (Linsen 11, 15) zur Lenkung des Strahlengangs mit dem bichromatischen Intensitätszeitprofil auf das Untersuchungsobjekt,
 - einer Detektoreinheit zur Umwandlung des vom Untersuchungsobjekt abgegebenen Fluoreszenzlichts in ein Meßsignal, wobei
 - die zwei Beleuchtungseinheiten jeweils einen Lichtleiter (3, 4) aufweisen, dessen Eintrittsöffnung über ein abbildendes System mit Licht von der ihm zugeordneten Lichtquelle (1, 2) beaufschlagt wird und dessen Austrittsöffnung in der Eintrittsspaltebene (5) des Beugungsgitters (6) liegt, und daß
 - die Austrittsöffnungen der Lichtleiter (3, 4) zur Einstellung der Wellenlängen des auf das Untersuchungsobjekt auftreffenden Lichts mit dem bichromatischen Intensitätszeitprofil relativ zueinander und zu dem Beugungsgitter (6) verschiebbar sind.
2. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in der Austrittsspaltebene (7) des Beugungsgitters (6) die Eintrittsöffnung eines weiteren Lichtleiters (8) liegt, an dessen Austrittsseite das abbildende System (15, 10, 11)

angekoppelt ist.

3. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die zwei Beleuchtungseinheiten gepulst sind.

4. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die zwei gepulsten Beleuchtungseinheiten zwei Blitzlampen als Lichtquellen (1, 2) aufweisen.

5. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die zwei gepulsten Beleuchtungseinheiten jeweils eine kontinuierliche Lichtquelle (1, 2) und einen im Strahlengang zwischen dieser Lichtquelle und dem Beugungsgitter (6) angeordneten ansteuerbaren Verschuß aufweisen.

6. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die zwei gepulsten Beleuchtungseinheiten eine gemeinsame kontinuierliche Lichtquelle und zwei im Strahlengang zwischen dieser Lichtquelle und dem Beugungsgitter (6) angeordnete, getrennt ansteuerbare Verschlüsse aufweisen.

7. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß eine elektrische, vorzugsweise rechnergesteuerte, Auslösevorrichtung zum Triggern der zwei Blitzlampen (1, 2) mit vorgegebenem zeitlichem Abstand vorgesehen ist.

8. Fluoreszenz-Meßvorrichtung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß eine elektrische, vorzugsweise rechnergesteuerte, Auslösevorrichtung zum Triggern des einen oder der zwei Verschlüsse mit vorgegebenem zeitlichem Abstand vorgesehen.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

BEST AVAILABLE COPY

